Recherche de substances inhibitrices - Test pour l'autorisation de reprise de livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices

1 Objet et domaine d'application

Cette note décrit les mesures prises par la Commission Nationale Interprofessionnelle Laitière (CNIL) pour la reprise des livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices au Comité du lait. Elle décrit les deux modes opératoires reconnus par les OI et devant être utilisés par les acheteurs.

Les deux tests sont les suivants

- Le test rapide βeta s.t.a.r. 25, sensible aux beta lactames et durant une dizaine de minutes.
- Le test Delvo-test T® sensible à un large spectre de substances inhibitrices et durant 3 heures

Cette note technique précise également dans quelles circonstances l'un ou l'autre test doit être utilisé.

2 Définitions

Néant

3 Références

- « βeta s.t.a.r. 25 : Mode d'emploi » (disponible dans chaque kit)
- PRO-INH-00001 : Procédure pour l'autorisation de reprise des livraisons de lait après un résultat défavorable en substances inhibitrices.

4 Modification par rapport à la version précédente

5.3 Utilisation du Delvo-test T en remplacement du Copan CMT

5 Contenu

5.1 Introduction

1er, 2ème ou 3ème résultat positif dans les 12 mois

Lors de la détection d'un résultat positif en substances inhibitrices du lait d'une exploitation, celui-ci ne peut plus être collecté par l'acheteur avant qu'il n'ait été contrôlé et afin de montrer qu'il est désormais exempt de toute trace de substances inhibitrices.

Le « Comité du Lait ASBL » informe l'acheteur d'un résultat positif en substances inhibitrices :

- la pénalisation résulte de la détection de substances inhibitrices de la famille des béta-lactames. L'acheteur testera le lait de l'exploitation avec le test βeta s.t.a.r 25 (§ 5.2)
- la pénalisation résulte de la détection de substances inhibitrices non béta-lactames. L'acheteur testera le lait de l'exploitation avec le test Delvo-test T ®(§ 5.3)

4ème résultat positif dans les 12 mois

L'échantillon est analysé au Comité du lait avec le βeta s.t.a.r 25, selon la procédure reprise ci-dessous. Si le résultat est négatif, l'échantillon est analysé avec le Delvo-test T® et confirmé avec les autres tests rapides (INT-MOP-00018 et INT-MOP-00019)

5.2 Le βeta s.t.a.r. 25

5.2.1 Principe de l'analyse

Le βeta s.t.a.r. est une méthode de type "Récepteur Assay" pour la recherche rapide, dans le lait de résidus actifs d'antibiotiques de la famille des β lactames (pénicillines, céphalosporines,...).

Le test est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié a des particules d'or. Au cours de la première étape d'incubation, les antibiotiques β lactames, s'ils sont présents dans l'échantillon de lait, se lient au récepteur. Pendant la deuxième étape d'incubation, le lait migre sur un support immunochromatographique qui présente deux bandes de capture.

- La première bande retient tous les récepteurs qui n'ont pas lié d'antibiotiques.
- La seconde bande sert de référence.

5.2.2 Réactifs

Le βeta s.t.a.r. 25 permet la réalisation de 25 analyses. Le coffret contient:

- 25 flacons contenant le récepteur sous forme lyophilisée.
- 1 flacon blanc contenant 25 tigettes.
- 1 seringue munie d'un ressort et 25 embouts jetables.
- 1 notice d'information
- Conservation du kit
    - Durée : jusqu'à la date de péremption
    - Température : 2-8 °C
    - Les réactifs sont stables jusqu'a la date de péremption inscrite sur l'emballage du coffret. Cependant les réactifs peuvent être maintenus hors du réfrigérateur pendant la durée des analyses.

5.2.3 Matériel

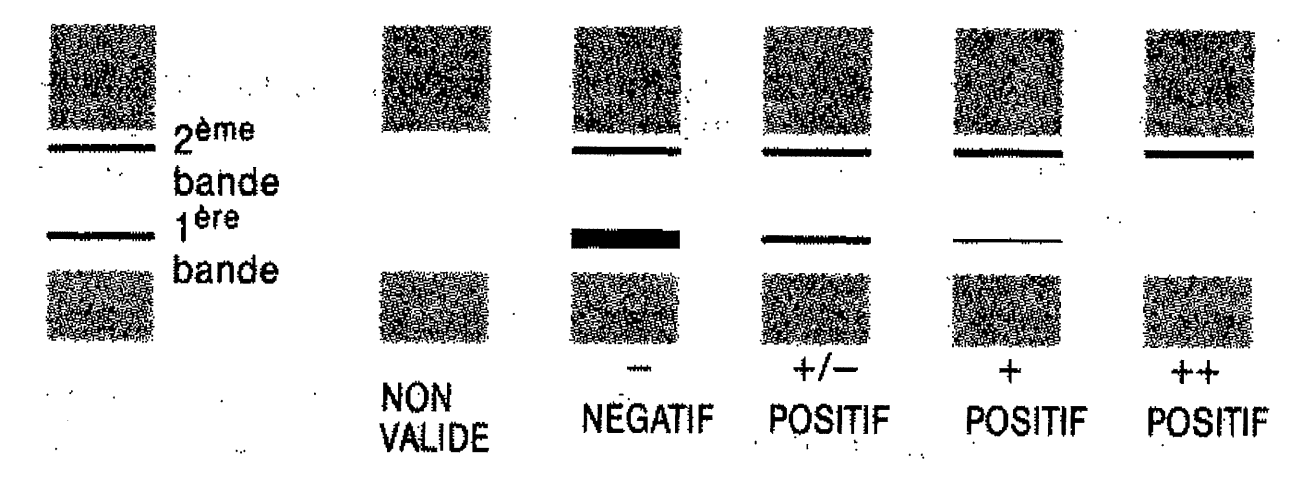
- Le kit contient les pipettes nécessaires à la réalisation du test
- Incubateur réglé sur 47.5 ± 1°C (utiliser de préférence le modèle du fournisseur, référence 619751)

5.2.4 Mode opératoire

- Suivre les instructions contenues dans la notice rédigée par le fabricant
- Faire chauffer l'incubateur et attendre sa stabilisation
- Retirer les réactifs (flacons et boîte de tigettes) du réfrigérateur 15 minutes avant utilisation.
- Prélever un échantillon dans le tank bien homogène (si nécessaire, lancer manuellement l'agitateur)
- Sortir un flacon du coffret et s'assurer que tout le lyophilisat se trouve au fond du flacon. Remarque: pour faire descendre le lyophilisat au fond du flacon, frapper délicatement le flacon sur une surface solide.
- Prélever 0.2ml de lait et les déposer dans le flacon
    - Enlever la capsule et le bouchon du flacon.
    - Placer un embout neuf sur la seringue.
    - Pousser le piston au fond de la seringue.
    - Immerger l'embout sur un centimètre dans l'échantillon de lait. Relâcher la pression sur le piston. Sous l'effet du ressort le piston remonte librement. Les 0,2 ml de lait prélevés remplissent complètement l'embout.
    - Distribuer les 0,2 ml de l'échantillon de lait dans le flacon contenant le récepteur en repoussant le piston au fond de la seringue.
    - S'assurer que l'embout ne contient plus de lait.
    - Remettre le bouchon.
    - Agiter doucement en renversant le flacon afin de dissoudre tout le lyophilisat.
- Mettre le flacon dans l'incubateur stabilisé à la température de 47,5 ± 1°C. Incuber pendant 3 minutes.
- Au bout de 3 minutes d'incubation
    - Les mains propres et sèches
    - Ouvrir le flacon blanc.
    - Sortir une tigette et l'identifier avec le numéro du producteur et la date d'échantillonnage.
    - Prendre une tigette et la déposer dans le flacon. Veiller à ce que les flèches de la tigette soient orientées vers le bas dans le flacon.
- Poursuivre l'incubation a 47,5 ± 1°C. 2 minutes après l'introduction de la tigette dans le flacon, retirer la tigette

5.2.5 Interprétation

- Interpréter immédiatement et visuellement le résultat comme suit :
  - Aucune bande rouge n'apparaît, le test est non valide, recommencer l'analyse. Cela peut se produire si les réactifs ne sont pas conformes ou si le lait est non conforme. Le test sera recommencer sur un lait « blanc » exempt se substances inhibitrices (par exemple un lait de consommation). Si le résultat est de nouveau non valide sur le blanc, les réactifs sont à mettre en cause. Le test devra être refait au siège de l'acheteur ou au « Comité du Lait ». Si l'échantillon blanc donne un résultat valable, le problème se situe au niveau du lait. On prélèvera un autre échantillon et on recommencera l'analyse. Si le résultat est toujours non valide, l'analyse devra être refaite au siège de l'acheteur ou au « Comité du Lait ».
  - La 1ère bande a une intensité
    - supérieure à celle de la bande référence → l'échantillon ne contient pas ou peu de résidus de substances inhibitrices de la famille beta lactames → le résultat est négatif (catégorie – sur le schéma).
    - égale ou inférieure à celle de la bande référence → l'échantillon contient des substances inhibitrices de la famille beta lactames → le résultat est POSITIF (catégorie + / - ou + sur le schéma)
    - très faible ou est absente → l'échantillon contient des substances inhibitrices de la famille beta lactames → le résultat est POSITIF (catégorie ++ sur le schéma)



- Enregistrer le résultat de l'analyse sur le document prévu dans la procédure PRO-LEG-00002 (modèle FEU-INH-00021) et le laisser à l'exploitation.
- La tigette est conservée par l'acheteur

5.2.6 Remarques et précautions

- Toujours changer l'embout de la pipette entre deux échantillons.
- Spectre de détection : tous les antibiotiques de la famille des β lactames peuvent être détectés par le βeta s.t.a.r. La plupart des spécialités vétérinaires autorisées pour le traitement par voie intra mammaire renferment des antibiotiques de cette famille tels que la pénicilline G, la cloxacilline, l'amoxicilline, la céphapirine, le céphalonium,... (Source : « beta s.t.a.r. 25 : Mode d'emploi »)
- Température d'incubation
  - La température d'incubation idéale est 47,5 °C +/- 1,0°C.
  - Au-dessous de 46°C, les réactions sont ralenties.
  - Au-dessus de 49°C, les réactifs peuvent subir une dégradation.
  - Dans les deux cas les performances du test sont modifiées et sa réponse devient incorrecte.
- Volume de lait : le volume de lait nécessaire pour effectuer un test βeta s.t.a.r. 25 est de 0,2 ml. La seringue à ressort fournie dans la boite βeta s.t.a.r. 25 est réglée pour délivrer 0,2 ml.
- Précautions

  - Lors de la mise en oeuvre du test βeta s.t.a.r. 25, il convient d'avoir les mains propres et sèches pour éviter toute contamination des réactifs.
  - Avant son ouverture, le flacon blanc devra être resté au moins dix minutes à la température normale.
- Environnement : le résultat d'un test de recherche de résidus d'antibiotiques pouvant être modifié par la présence accidentelle de molécules actives dans l'environnement, il est recommandé d'éviter la mise en oeuvre du βeta s.t.a.r. par toute personne subissant un traitement a base de β lactames.

5.3 Le Delvotest ®T ampoules

5.3.1 Principe de l'analyse

Le principe de l'analyse est basé sur la diffusion d'un échantillon de lait dans un milieu Agar ensemencé avec une souche bactérienne « GeoBacillus ». Après incubation pendant une durée déterminée (typiquement 3h00), s'il y à absence de substances inhibitrices dans l'échantillon, la souche bactérienne se développe, acidifie le milieu, et provoque le virage du pourpre au jaune de l'indicateur de pH présent dans le milieu. En présence de substances inhibitrices, l'acidification est freinée et la coloration ne varie pas ou peu.

5.3.2 Réactifs

- Le kit contient 25 ou 100 tubes (Delvotest ® T ampoules)
  - Chaque tube contient une gélose nutritive, d'un indicateur de pH et de triméthoprime, ensemencé avec des spores d'un micro-organisme test
  - Chaque kit a un numéro de lot
  - Précautions
    - Eviter les fortes variations de température
    - Ne pas congeler (dénaturation de la gélose)
    - Eviter les températures < 4°C
    - Lors de la réception d'une livraison, contrôler que le témoin de températures hautes de chaque boîte n'a pas viré du gris au noir
  - Conservation
    - Durée : jusqu'à la date de péremption
    - Température : 5-16 °C

5.3.3 Matériel

- Chaque kit contient les pipettes nécessaires au prélèvement de 100 µl de lait
- Un incubateur réglé à 64 ± 1°C DSM Incubator, fourni par le fabricant)

5.3.4 Mode opératoire

- Suivre les instructions contenues dans la notice rédigée par le fabricant
- Faire chauffer l'incubateur et attendre sa stabilisation
- Prélever un échantillon dans le tank bien homogène (si nécessaire, lancer manuellement l'agitateur)
- A l'aide de la micro pipette prélever 100 µl de lait et les déposer dans le tube
- Incuber durant 3h00 ± 5 minutes le tube à 64 ± 1°C (incubateur DSM)

5.3.5 Interprétation

- Après incubation, interpréter immédiatement (5 minutes maximum) la coloration à l'aide de la carte fournie par le fabricant et en conclure la présence ou absence de substances inhibitrices dans l'échantillon
- Enregistrer le résultat de l'analyse sur le document prévu dans la procédure PRO-LEG-00002 (modèle FEU-INH-00021) et le laisser à l'exploitation.

5.3.6 Remarques et précautions

- Toujours changer de pipette entre deux échantillons
- Le Delvotest T ® est un test capable de détecter un large spectre de substances inhibitrices.
- Quelques remarques importantes :
  - Il est très important de ne pas dépasser la durée d'incubation prescrite par le fabricant car celle-ci a une répercussion directe sur la sensibilité du test.
  - Si le lait contient des substances de type désinfectant, anti-parasitaire ou que le pH est élevé (dans le cas de mammites par exemple), il peut y avoir détection de positifs.
  - La présence d'un agent conservateur dans le lait peu entraîner un résultat positifs.